昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2009, 52(9): 959 – 966 ISSN 0454-6296

河北异小杆线虫一品系的分类鉴定及其对蛴螬致病力的测定

刘树森, 李克斌[1,*], 刘春琴[2], 王庆雷[2], 尹 姣[1], 曹雅忠[1]
(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 河北省沧州市农林科学院, 河北沧州 061001)

摘要: 昆虫病原线虫是一种有应用潜力的地下害虫生物防治因子。本研究利用形态学特征和 ITS-rDNA 分析方法对从河北省沧州分离的异小杆线虫一品系进行了鉴定, 并在室内测定比较了其对蛴螬的致病力。通过对该线虫侵染期幼虫和雄性成虫主要形态学特征的参数测量, 发现其与嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 的形态特征最为相近;同时 ITS1-rDNA 序列比对和系统发育学分析结果显示其与嗜菌异小杆线虫亲缘关系最近。结合形态学和分子生物学特征, 确定该线虫为嗜菌异小杆线虫沧州品系。该线虫对蛴螬(华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita*、暗黑鳃金龟 *H. parallela* 和铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* 3 种金龟子的 2 龄幼虫)的致病力研究结果表明:处理 72 h 后, 暗黑鳃金龟幼虫死亡率显著高于另外两种金龟子幼虫 ($P<0.05$);处理 120 h 后, 暗黑鳃金龟和铜绿丽金龟幼虫的死亡率分别达到 93.3% 和 80.0%, 二者无显著差异 ($P>0.05$), 可见该线虫对它们有较强的致病力。不同线虫对暗黑鳃金龟幼虫的致病力结果显示, 嗜菌异小杆线虫沧州品系侵染 96 h 后, 幼虫的死亡率显著高于 *Steinernema feltiae* 和 *S. longicaudum* 两种线虫的处理 ($P<0.05$), 说明嗜菌异小杆线虫沧州品系的致病力显著高于另外两种线虫。

关键词: 嗜菌异小杆线虫; 蛴螬; 分类地位; 形态学特征; ITS 区序列分析; 致病力
中图分类号: Q965.8 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)09-0959-08

Identification of a strain of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from Hebei and its virulence to white grubs

LIU Shu-Sen[1], LI Ke-Bin[1,*], LIU Chun-Qin[2], WANG Qing-Lei[2], YIN Jiao[1], CAO Ya-Zhong[1] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Cangzhou Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Cangzhou, Hebei 061001, China)

Abstract: Entomopathogenic nematode is a potential factor for biological control of underground pest. A strain of *Heterorhabditis* isolated from Cangzhou of Hebei province was identified based on the morphological characters and ITS-rDNA sequence analysis, its virulence to white grubs was also determined in the laboratory. Morphological measurement of infective juveniles and males showed that the population was most closely related to *Heterorhabditis bacteriophora*, while the results of ITS1-rDNA sequences alignment and phylogenetic analysis indicated that the population had the closest genetic relationship with *H. bacteriophora*. Based on the morphology and biological characters, the population was identified as *H. bacteriophora* strain Cangzhou. Pathogenicity tests of the nematode to white grubs (2nd instar larvae of *Holotrichia oblita*, *H. parallela* and *Anomala corpulenta*) showed that the mortality of *H. parallela* larvae was significantly higher than that of the other two scarabes ($P<0.05$) after infection of 72 h. After 120 h, the mortality of *H. parallela* and *A. corpulenta* larvae were 93.3% and 80.0%, respectively, without significant difference ($P>0.05$), suggesting that the nematode has strong virulence against them. Virulence tests of different nematodes to larvae of *H. parallela* indicated that the larvae which were infected by *H. bacteriophora* strain Cangzhou had higher mortality than those infected by *Steinernema feltiae* and *S. longicaudum* after infection of 96 h ($P<0.05$), suggesting that the virulence of *H. bacteriophora* strain

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD08A05)
作者简介: 刘树森, 男, 1982 年生, 河北献县人, 硕士研究生, 研究方向为生物防治, E-mail: shusenliu@163.com
*通讯作者 Author for correspondence, E-mail: likebin54@163.com
收稿日期 Received: 2009-02-20; 接受日期 Accepted: 2009-06-28

Cangzhou is significantly higher than the other two nematodes.

Key words: *Heterorhabditis bacteriophora*; white grubs; taxonomic status; morphological characters; ITS-rDNA analysis; virulence

蛴螬(white grubs)是金龟子幼虫的统称，属鞘翅目(Coleoptera)金龟总科(Scarabaeoidea)，是世界上较难防治的地下害虫之一。蛴螬的食性较杂，可危害多种农作物、蔬菜及其他经济作物的地下部分。近年来，随着免耕耕作方式的推广、草坪业在城镇绿化中的发展等，使蛴螬对环境的适应能力得到了增强，危害呈逐年上升趋势(罗晨等，2008)。昆虫病原线虫(entomopathogenic nematode)作为害虫的专性寄生性天敌，因其具有携带强致病力共生细菌、杀虫速度快、能主动搜索寄主、无公害以及无抗性产生等优点，成为目前最具潜力的生物杀虫剂之一(Ehlers，1996)，已经被广泛地应用于多种害虫的生物防治(Dunphy and Thurston，1990；Georgis and Gaugler，1991；Samish and Glazer，2001)，并且成功地应用于防治蛴螬(Koppenhöfer and Fuzy，2003；Grewal *et al.*，2004)。异小杆科(Heterorhabditidae)线虫是线虫与发光杆菌 *Photorhabdus* sp. 的复合体(王立霞等，2001)。当感染期幼虫主动或被动通过昆虫口腔、肛门和气门等自然开口或直接由表皮侵入到昆虫体内后，便向寄主血腔释放与其共生的共生细菌，线虫与细菌共同作用，最终导致寄主患败血症死亡(丛斌等，1999)。

昆虫病原线虫广泛存在于土壤中，对环境的温湿度、紫外线强度有较高要求，而当地的优势种群对本地的地理环境、土壤类型及质地等都有较强的适应性，在土栖性的地下害虫防治中具有更为广阔的应用前景。因此，我们针对黄淮海地区为害严重的优势种蛴螬开展筛选致病力强的昆虫病原线虫种群，在确定该种群的分类地位的同时，测定该种群对黄淮海地区3个优势种蛴螬的致病力，将为本地区应用昆虫病原线虫优势种群防治蛴螬提供有效的生防措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 昆虫病原线虫的诱集与分离

在河北省沧州市郊及周边县的乡镇采集土样。将采集的土样带回到室内后分别装进塑料盒中，并放入5～6头大蜡螟 *Galleria mellonella* 末龄幼虫作为活体寄主诱集土样中的昆虫病原线虫。在20～25℃的条件下培养，5～6 d后将感染病原线虫致死的大蜡螟尸体收集起来以获得昆虫病原线虫侵染期幼虫(injective juveniles，ijs)(White，1927)。然后在直径为60 mm的一次性培养皿底部垫2层滤纸，滤纸上滴加一定浓度收集到的线虫悬浮液，并将5～6头大蜡螟末龄幼虫放入培养皿中，使昆虫病原线虫重新感染大蜡螟，进一步纯化所得到的昆虫病原线虫。最后将收集到的昆虫病原线虫侵染期幼虫置于8～12℃冰箱中，用含0.1%甲醛水溶液的海绵保存。

1.2 昆虫病原线虫的形态学鉴定

昆虫病原线虫的形态学鉴定主要对待鉴定异小杆类线虫的第1代和第2代成虫以及侵染期幼虫的特征参数进行测量。在大蜡螟感染昆虫病原线虫死后的第3～4天和第7～8天解剖尸体，分别收集第1代和第2代成虫，并收集第一周内所产生侵染期幼虫(Nguyen and Smart，1995)。侵染期幼虫和成虫在Ringer溶液中热杀死(60℃，3 min)，用FA固定液固定后，在显微镜下进行特征参数的测量(Seinhorst，1959)。由于雌虫形态变异较大，不适合用于线虫的分类，所以仅对侵染期幼虫和雄性成虫的形态特征进行了详细的测量。

1.3 昆虫病原线虫的分子生物学鉴定

参照Nguyen等方法(Nguyen *et al.*，2001；Phan *et al.*，2005)，并略作修改。在洁净的载玻片上滴15 μL双蒸水，挑入单条侵染期幼虫，用手术刀将其切成2段，迅速吸取线虫悬浮液10 μL，加入到含8 μL预冷WLB液(10 mmol/L Tris-HCl，500 mmol/L KCl，15 mmol/L $MgCl_2$，1.0 mmol/L DDT，0.45% Tween 20)的200 μL离心管中，最后加入2 μL预冷的蛋白酶K溶液(600 μg/mL)，总体积为20 μL。迅速将离心管置于(70℃超低温冰箱保存15～30 min，65℃温育60 min，95℃温育10 min，使蛋白酶失活。温育后于12 000 rpm高速离心2 min，取其上清液用于PCR扩增或者于-20℃保存备用。

取3 μL上清液，采用通用引物18 S和26 S对ITS间隔区进行PCR扩增。18 S序列为：5′-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3′，26 S序列为：5′-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3′，由上海生物工程

技术服务有限公司合成。PCR 反应体系：2.5 μL 10×PCR buffer（含有 1.5 mmol/L Mg^{2+}），2 μL dNTPs（每种 2.5 mmol/L），0.3 μL 引物（10 μmol/L），1.5 U Taq 聚合酶，3 mL DNA 模板，双蒸水补至总体积为 25 μL。采用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit（北京全式金生物技术有限公司）对 PCR 产物进行回收。纯化的 DNA 片段与 pGEM-T Easy（Promega 公司）连接产物转化至 DH5α 感受态细胞，并在含有氨苄青霉素抗性的 LB 琼脂平板上 37℃过夜培养。挑取单菌落于抗性的 LB 液体培养基，37℃恒温摇床培养过夜。使用 BIO BASIC INC. EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini Preps Kit 提取重组质粒，并用 EcoR Ⅰ进行单酶切，电泳检测酶切产物片段的大小。

由上海生物工程技术服务有限公司测序部负责测序工作，并提供测序结果。测序样品不少于 3 个克隆，以保证测序结果的准确性。将所得的 ITS-rDNA 序列通过 Primer Premier 5 编辑，再利用 DNAMAN 将待鉴定线虫种群的 ITS1-rDNA 基因序列与 9 种已知异小杆线虫的 ITS1-rDNA 序列进行比较，同时用 MEGA 软件构建系统发育树。已知异小杆线虫的 ITS1-rDNA 序列分别从 GenBank 获得：*Heterorhabditis bacteriophora* Poinar，1976（AF029708）；*H. argentinensis* Stock，1993（AF029706）；*H. hawaiiensis* Gardner *et al.*，1994（AF029707）；*H. indica* Poinar *et al.*，1992（AF029710）；*H. downesi* Stock *et al.*，2001（AF029712）；*H. marelatus* Liu and Berry，1996（AF029713）；*H. baujardi* Long *et al.*，2003（AF548768）；*H. zealandica* Poinar，1990（AY170330）；*H. megidis Poinar et al.*，1987（AY293284）。

1.4　昆虫病原线虫对蛴螬致病力的测定

1.4.1　供试虫源：试验所用昆虫病原线虫分别为分离自沧州并得到鉴定的嗜菌异小杆线虫沧州品系 *H. bacteriophora* strain Cangzhou，以及河北省农林科学院植物保护研究所线虫室提供的 *Steinernema feltiae* 和 *S. longicaudum*。试验均采用 3 龄幼虫（侵染期幼虫），由大蜡螟末龄幼虫培养。

蛴螬：本试验所用的蛴螬分别为华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita*、暗黑鳃金龟 *H. parallela* 以及铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* 3 种金龟子的 2 龄幼虫。通过诱虫灯诱捕或到田间人工抓捕成虫，带回室内饲养于铺有厚度约为 30 cm、湿度为 15% 左右的细壤土的塑料盒（50 cm×70 cm）中，以榆树叶、黄杨叶、玉米叶等为食物。产卵后将卵置于湿度为 15% 左右的土壤中，在 25℃下统一孵化。幼虫在装有 15%～18% 湿度土壤的牙签盒中饲养，每盒 1 头，以马铃薯块、玉米种子、小麦种子等为饲料饲养至 2 龄。

1.4.2　嗜菌异小杆线虫沧州品系对 3 种蛴螬的致病力比较：在土壤含水量 18%，温度 25℃的条件下，测定嗜菌异小杆线虫沧州品系分别对华北大黑鳃金龟、暗黑鳃金龟和铜绿丽金龟 3 种金龟子幼虫的致病力。将 1 头幼虫和数块马铃薯（切成0.5 cm^3 的小块）置于牙签盒底，然后加灭菌土（土壤含水量约为 18%）约 30 g，最后滴加浓度为 200 ijs/50 μL 的线虫悬浮液 50 μL。每处理设 3 个重复，每重复 20 头幼虫，同时以滴加无菌水作为对照。每隔 24 h 检查金龟子幼虫的死亡情况，检查时直接通过透明的牙签盒壁观察幼虫的死亡情况，以幼虫体色变红并停止活动记作线虫感染致死。

1.4.3　3 种昆虫病原线虫对暗黑鳃金龟幼虫致病力的比较：在土壤含水量 18%，温度 25℃的条件下，比较嗜菌异小杆线虫沧州品系、*S. feltiae* 和 *S. longicaudum* 3 种昆虫病原线虫对暗黑鳃金龟 2 龄幼虫的致病力。将 1 头暗黑鳃金龟幼虫和数块马铃薯（切成 0.5 cm^3 的小块）置于牙签盒底，然后加灭菌土（土壤含水量约为 18%）约 30 g，最后滴加浓度为 200 ijs/50 μL 的线虫悬浮液 50 μL，将牙签盒密封防治水分蒸发，只在盒盖留有小孔以便交换空气。每处理设 3 个重复，每重复 15 头幼虫，同时以滴加无菌水作为对照。每隔 24 h 检查幼虫的死亡情况（方法同上）。

1.5　数据统计分析

所有数据计算均在 Excel 2003 与 SPSS14.0 for Windows 统计分析软件上完成，处理间经方差分析统计差异显著后，用 Duncan 氏多重比较方法进行显著性测定。昆虫病原线虫对金龟子幼虫的致病力均用金龟子幼虫的死亡率（%）表示。

2　结果与分析

2.1　昆虫病原线虫的形态学鉴定

表 1 是对待鉴定线虫侵染期幼虫有关形态特征参数的测量数据，表 2 是雄性成虫有关参数的测量数据；其中将待鉴定线虫与 5 个形态学相近的已知线虫种进行了各参数特征的比较。根据形态特征参数测量和比对的结果，初步认为分离获得的昆虫病原线虫与嗜菌异小杆线虫 *H. bacteriophora* 相似度较高。

表 1 待鉴定异小杆类昆虫病原线虫的侵染期幼虫与 5 种异小杆线虫侵染期幼虫的形态比较

Table 1 The morphometrics of ijs of *Heterorhabditis* sp. to be identified and other five *Heterorhabditis* species

性状 Characters	*H. zealandica*	*H. bacteriophora*	*H. megidis*	*H. marelatus*	*H. argentinensis*	*H.* sp
体长(BL) Body length	685 (570 – 740)	588 (512 – 670)	768 (736 – 800)	640 (540 – 780)	657 (610 – 710)	550.50 (530.00 – 560.00)
最大体宽(BW) Maximal body width	27 (22 – 39)	23 (13 – 31)	29 (27 – 32)	24 (16 – 34)	31 (24 – 38)	21.75 (20.00 – 22.50)
头至排泄孔距离(HE) Head to excretory pore	112 (94 – 123)	103 (87 – 110)	131 (123 – 142)	103 (85 – 112)	–	95.95 (92.5 – 97.5)
头至神经环距离(HN) Head to nerve ring	100 (90 – 107)	85 (75 – 93)	109 (104 – 115)	87 (65 – 100)	–	85.80 (82.50 – 88.00)
食道长(OL) Oesophagus length	140 (135 – 147)	125 (100 – 139)	155 (147 – 160)	120 (110 – 133)	–	121.25 (120.00 – 125.00)
尾长(TL) Tail length	102 (87 – 119)	98 (83 – 112)	119 (112 – 128)	61 (50 – 78)	84 (70 – 105)	84.88 (82.50 – 90.00)
BL/BW	25 (24 – 26)	25 (17 – 30)	26 (23 – 28)	26 (17 – 35)	21 (19 – 25)	25.35 (23.56 – 28.00)
BL/OL	4.9 (4.2 – 5.0)	4.5 (4.0 – 5.1)	5.0 (4.6 – 5.9)	5.5 (4.5 – 6.5)	–	4.54 (4.37 – 4.67)
BL/TL	6.6 (6.2 – 6.7)	6.2 (5.5 – 7.0)	6.5 (6.1 – 6.9)	9.5 (8.5 – 11.5)	7.8 (6.8 – 8.7)	6.49 (5.89 – 6.79)
HE /OL	0.80 (0.70 – 0.84)	0.84 (0.76 – 0.92)	0.85 (0.81 – 0.91)	0.8 (0.7 – 0.9)	–	0.79 (0.76 – 0.81)
HE/TL	1.08 (1.03 – 1.09)	1.12 (1.03 – 1.30)	1.10 (1.03 – 1.20)	1.5 (1.3 – 1.7)	1.27	1.13 (1.08 – 1.18)
BL/TL	0.25 (0.24 – 0.26)	0.25 (0.22 – 0.36)	0.25 (0.23 – 0.28)	0.23 (0.20 – 0.25)	0.37	0.26 (0.24 – 0.27)

表中 *H.* sp. 为待鉴定线虫; *H. zealandicad*, *H. bacteriophora*, *H. megidis* 和 *H. marelatus* 的测定数据来自 Hominick (1997), *H. argentinensis* 的测定数据来自 http://kbn. ifas. ufl. edu/kbnstein. htm; 表中长度单位均为 μm; 下同。*H.* sp is the nematode to be identified; the data of *H. zealandicad*, *H. bacteriophora*, *H. megidis*, *H. marelatus* are from Hominick (1997), while the data of *H. argentinensis* are from http://kbn. ifas. ufl. edu/kbnstein. htm. The length was scaled in μm. The same below.

表 2 待鉴定异小杆类昆虫病原线虫的雄性成虫与 5 种异小杆线虫雄成虫的形态比较

Table 2 The morphometrics of the males of *Heterorhabditis* sp. to be identified and other five *Heterorhabditis* species

性状 Characters	*H. zealandica*	*H. bacteriophora*	*H. megidis*	*H. marelatus*	*H. argentinensis*	*H.* sp.
体长 (BL) Body length	1 008 (823 – 1 150)	831 (620 – 940)	892 (780 – 1 001)	910 (800 – 1 010)	–	927.50 (870.00 – 980.00)
最大体宽(BW) Maximal body width	51 (40 – 64)	51 (38 – 64)	48 (46 – 53)	68 (49 – 97)	56 (42 – 70)	44.60 (42.00 – 47.50)
头至排泄孔距离(HE) Head to excretory pore	144 (83 – 172)	125 (106 – 136)	135 (129 – 148)	115 (102 – 130)	–	125.75 (120.00 – 130.00)
头至神经环距离(HN) Head to nerve ring	85 (60 – 102)	76 (68 – 83)	98 (79 – 110)	101 (83 – 114)	–	64.10 (58.75 – 70.00)
食道长(OL) Oesophagus length	119 (76 – 135)	117 (95 – 130)	127 (115 – 134)	125 (114 – 139)	–	101.95 (99.50 – 105.0)
尾长(TL) Tail length	40 (33 – 46)	36 (26 – 43)	40 (30 – 46)	39 (36 – 49)	–	32.40 (28.75 – 36.50)
交接刺长度(SL) Spicule length	49 (46 – 52)	36 (31 – 41)	42 (36 – 47)	48 (42 – 52)	46 (42 – 49)	37.42 (35.00 – 39.50)
引带长度(GL) Gubernaculums length	20 (18 – 23)	18 (14 – 21)	19 (16 – 24)	22 (17 – 24)	23 (20 – 26)	17.75 (16.50 – 19.00)
肛门处宽(AW) Anal body width	27 (22 – 32)	28 (23 – 34)	30 (26 – 36)	27 (24 – 30)	–	30.00 (28.00 – 31.00)
SW	1.81 (1.60 – 2.09)	1.28 (1.20 – 1.34)	1.35 (1.30 – 1.40)	1.75 (1.73 – 1.78)	–	1.25 (1.16 – 1.36)
GS	0.41 (0.3 – 0.45)	0.48 (0.45 – 0.51)	0.45 (0.44 – 0.51)	0.42 (0.40 – 0.46)	0.5	0.47 (0.45 – 0.52)

SW = SL/AW; GS = GL/SL.

2.2 昆虫病原线虫的分子生物学鉴定

单条线虫的 PCR 扩增产物片段大小在 1 000 bp 左右。待鉴定线虫 *H.* sp. 与其他 9 种已知异小杆类昆虫病原线虫的 ITS1-rDNA 序列比对结果见图 1。*Heterorhabditis* sp. 的 ITS1 序列长度范围从 387 bp (*H. downesi*) 至 415 bp(*H. baujardi*)。待鉴定线

虫的 ITS1 序列与 *H. bacteriophora* 的 ITS1 序列有 4 个碱基不同，碱基差异仅为 1%；与 *H. argentinensis* 的 ITS1 序列有 6 个碱基不同，差异为 1.49%；而与另外几种已知线虫种类的 ITS1 序列碱基差异则为 85～107 bp，差异高达 17.53%～26.29%，表明待鉴定线虫的 ITS1 序列与 *H. bacteriophora* 和 *H. argentinensis* 的同源性比较高。进一步用 MEGA 软件，对待鉴定线虫 *H.* sp. 的 ITS1-rDNA 序列和其他线虫的已知同源序列进行系统发育学分析，分析结果见图 2。从图中可以看出，待鉴定线虫与 *H. bacteriophora*、*H. argentinensis* 两个种在同一个进化分枝上，而与其他种均相距较远。说明待鉴定线虫与 *H. bacteriophora* 和 *H. argentinensis* 的同源性较高，亲缘关系最近。所以，综合形态学和分子生物学的鉴定结果，可将待鉴定线虫暂定为嗜菌异小杆线虫沧州品系 *H. bacteriophora* strain Cangzhou。

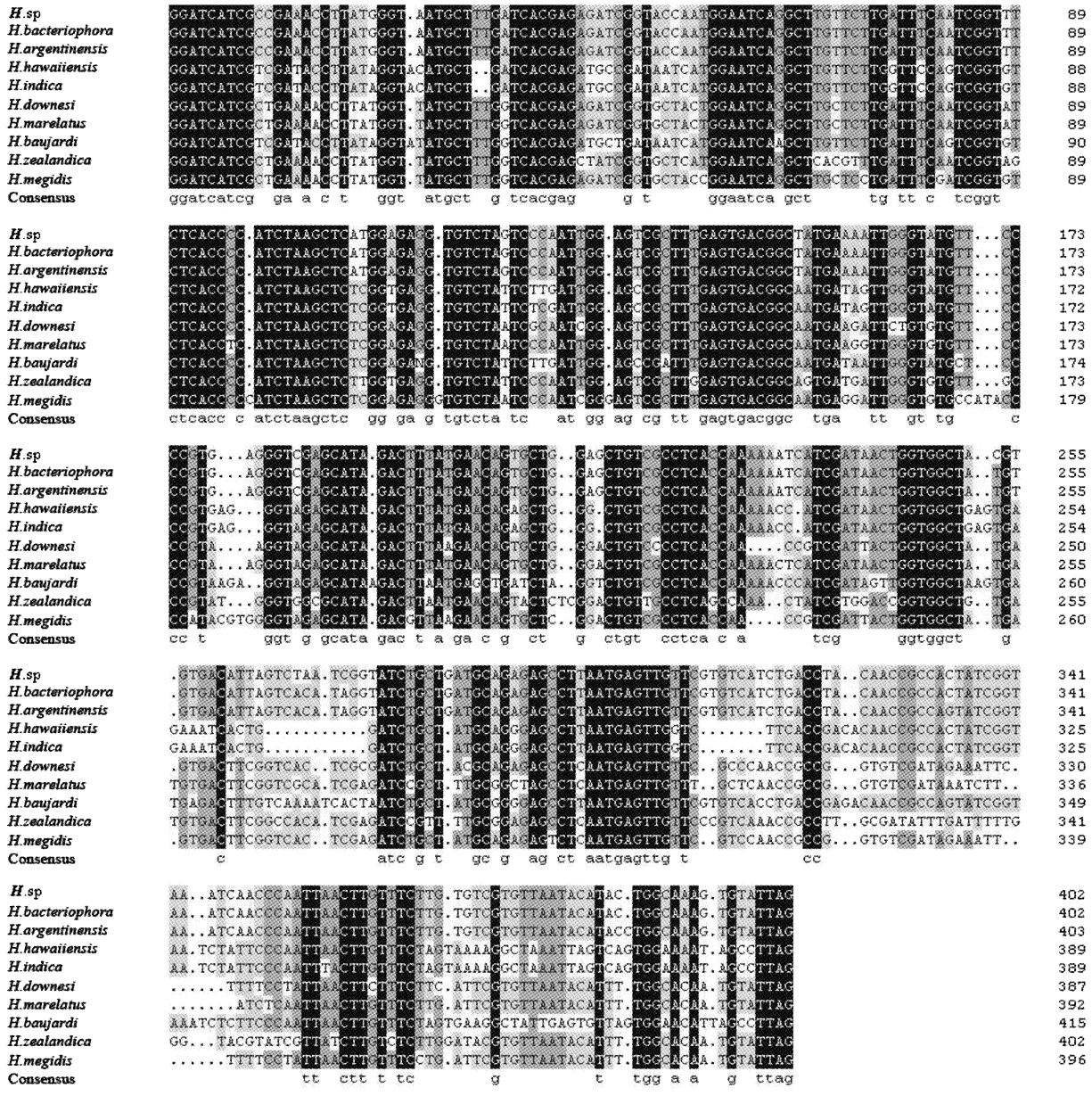


图 1　待鉴定昆虫病原线虫 TS1-rDNA 序列与其他异小杆线虫的同源序列比较

Fig. 1 The alignment of ITS1-rDNA sequences of *Heterorhabditis* sp. to be identified with the known homologous sequences of other *H.* spp.

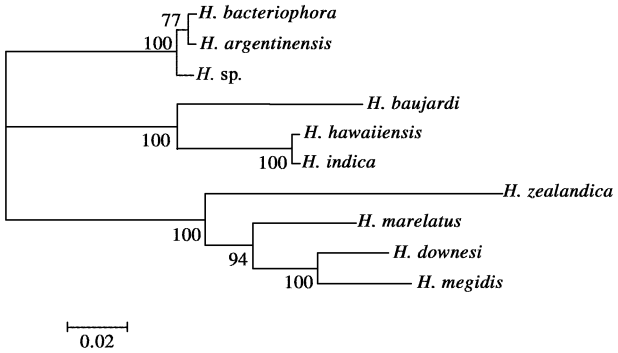


图 2 异小杆线虫的 ITS1-rDNA 序列分析聚类结果

Fig. 2 Dendrogram of ITS1-rDNA sequence analysis of *Heterorhabditis* spp.

2.3 嗜菌异小杆线虫沧州品系对 3 种金龟子幼虫的致病力比较

从试验结果(图 3)看，自始至终嗜菌异小杆线虫沧州品系对暗黑鳃金龟幼虫的致死率均高于对其他两种金龟子幼虫的致病力。感染寄主 48 h，华北大黑鳃金龟和铜绿丽金龟幼虫的死亡率分别为 3.3% 和 6.6%，暗黑鳃金龟幼虫的死亡率为 23.3%；感染 72 h，暗黑鳃金龟幼虫的死亡率为 66.6%，华北大黑鳃金龟和铜绿丽金龟幼虫的死亡率分别为 3.3% 和 23.3%，暗黑鳃金龟幼虫与其他两种金龟子幼虫的死亡率之间存在着明显的差异($P<0.05$)。随着感染寄主时间的延长，嗜菌异小杆线虫沧州品系对 3 种金龟子幼虫的致病力不断增高。感染 96 h 和 120 h，暗黑鳃金龟幼虫的死亡率分别达到 83.3% 和 93.3%，铜绿丽金龟幼虫的死亡率分别为 63.3% 和 80.0%。嗜菌异小杆线虫沧州品系感染寄主 96 h 以后，暗黑鳃金龟幼虫和铜绿丽金龟幼虫的死亡率之间没有明显差异，但这二者死亡率与华北大黑鳃金龟幼虫死亡率之间存在着明显差异($P<0.05$)。

2.4 3 种昆虫病原线虫对暗黑鳃金龟幼虫致死率比较

3 种昆虫病原线虫对暗黑鳃金龟幼虫致死率比较结果见图 4。分析结果表明，供试的 3 种昆虫病原线虫对暗黑鳃金龟幼虫的致病力总体上存在显著差异($P<0.05$)，且致病力随昆虫病原线虫的种类和感染寄主的时间长短而异。昆虫病原线虫感染寄主 24 h 时，*S. feltiae* 的致死率最高，为 13.33%，但 3 种线虫对寄主的致病力之间差异不显著($P>0.05$)；感染 48 h 和 72 h 时，嗜菌异小杆线虫沧州品系对暗黑鳃金龟幼虫的致病力略高于 *S. feltiae*，无显著差异，但二者与 *S. longicaudum* 对暗黑鳃金龟幼虫的致病力之间存在显著差异($P<0.05$)。当嗜菌异小杆线虫沧州品系感染寄主 96 h 和 120 h 后，暗黑鳃金龟幼虫的死亡率分别达到了 87% 和 93%，显著高于另外两种线虫($P<0.05$)。由此可见，嗜菌异小杆线虫沧州品系对暗黑鳃金龟幼虫的致病力高于另两种斯氏线虫。

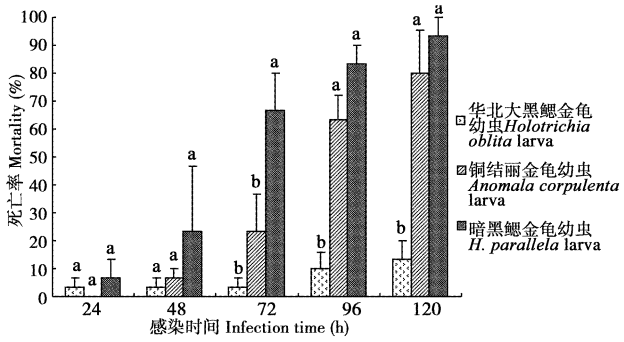


图 3 嗜菌异小杆线虫沧州品系对 3 种金龟子幼虫的致病力

Fig. 3 Virulence of *Holotrichia bacteriophora* strain Cangzhou to larvae of three scarabs

柱上不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)；图 4 同。Bars with different lowercase letters indicate significant differences between different treatments ($P<0.05$). The same for Fig. 4.

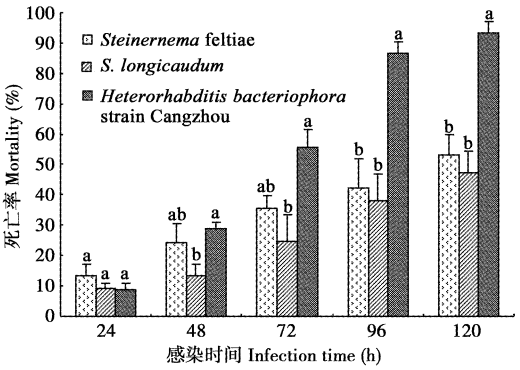


图 4 3 种昆虫病原线虫对暗黑鳃金龟幼虫的致病力比较

Fig. 4 Virulence of three entomopathogenic nematodes to larvae of *Holotrichia parallela*

3 讨论

通过对河北省沧州市市郊及周边县的乡镇采集的土样进行筛选，得到了一种异小杆类病原线虫，并对其进行了种类鉴定。形态学鉴定作为传统的鉴定方法，已经证实很难达到对昆虫病原线虫准确鉴定的要求，而异小杆类线虫形态特征在进化过程中的保守性导致不同种类之间的差异较小，同时种内不同种群之间的变异幅度又比较大，所以仅仅靠形态学上的差异已不能对异小杆类线虫进行准确的鉴定。随着分子生物学的发展，RAPD 分析、RFLP 分

析以及 DNA 序列分析等各种以 DNA 为基础的分子生物学技术被应用于昆虫病原线虫的分类鉴定和遗传分析（Reid and Hominick，1992；Joyce *et al.*，1994；Liu and Berry，1995；Hashmi *et al.*，1996），并为异小杆类病原线虫的分类提供了可靠的依据。

本文采用形态学和分子生物学相结合的方法对分离到的昆虫病原线虫进行了鉴定。对该线虫进行了相关特征参数测量，并和其他已知种的参数进行比对，初步认为该线虫与嗜菌异小杆线虫 *H. bacteriophora* 比较相近。为进一步确定该线虫的分类地位，特对其 ITS 区序列进行分析，该技术在昆虫病原线虫分子生物学分类研究中应用较多（Adams *et al.*，1998；Stack *et al.*，2000；Nguyen *et al.*，2001）。但是，目前所有异小杆类病原线虫的 ITS 信息不是很完整，所以本研究只是对该线虫的 ITS1 区序列进行了分析。通过 ITS1 序列对比，发现该线虫与 *H. bacteriophora* 的碱基差异仅为 1%，与 *H. argentinensis* 的碱基差异也小于 1.5%，而与其他几种线虫的碱基差异则均在 17% 以上；从系统发育学分析，该线虫与 *H. bacteriophora* 和 *H. argentinensis* 同源性更高。因此，结合形态学鉴定和分子生物学鉴定的结果，将该线虫确定为嗜菌异小杆线虫沧州品系。

本研究测定了嗜菌异小杆线虫沧州品系对当地重要地下害虫华北大黑鳃金龟、铜绿丽金龟及暗黑鳃金龟 3 种金龟子 2 龄幼虫的致病力。从试验结果看，该线虫对暗黑鳃金龟幼虫感染致死作用效果最好，对铜绿丽金龟次之，对华北大黑鳃金龟作用效果最差。另外有试验证明，随着金龟子幼虫龄期的增长，该线虫对铜绿丽金龟幼虫的致死率逐渐增高，而暗黑鳃金龟幼虫的死亡率却有所下降，说明嗜菌异小杆线虫沧州品系对金龟子幼虫的致病力与幼虫的龄期大小有关，可能是 3 龄幼虫发达的体毛影响了线虫侵染。

本研究还比较了嗜菌异小杆线虫沧州品系同 *S. feltiae* 和 *S. longicaudum* 两种斯氏线虫对暗黑鳃金龟 2 龄幼虫的致病力。其中 *S. feltiae* 被用于防治鞘翅目害虫（李小峰和王国汉，1990；Ansari *et al.*，2003），而 *S. longicaudum* 对防治高尔夫球场的蛴螬也有较好的效果（张中润等，2006）。线虫侵染暗黑鳃金龟幼虫 96 ~ 120 h，嗜菌异小杆线虫沧州品系对金龟子幼虫的致病力要显著高于 *S. feltiae* 和 *S. longicaudum* 对金龟子幼虫致病力。另外，根据线虫的活动能力强弱，Grewal 等（1994）将线虫搜寻寄主的方式确定为由潜伏到巡航搜寻。活动能力较强的线虫种类一般对土壤深层活动能力较弱的昆虫有较好的防治效果。陈书龙等（2004）研究证明 *H. megidis* 线虫具有很强的活动能力，而嗜菌异小杆线虫沧州品系和 *H. megidis* 同属于异小杆科。*S. feltiae* 具有巡航者可直接对昆虫分泌物产生反应的特性，同时又具有潜伏者的特点，但在粗糙表面上活动距离较短，活动能力相对较弱。因此，嗜菌异小杆线虫沧州品系对暗黑鳃金龟幼虫的致死率高于 *S. feltiae* 和 *S. longicaudum* 可能与它们的活动能力强弱有密切关系。

土壤中拥有丰富的昆虫病原线虫资源。昆虫病原线虫对寄主的专一性以及对地理因素和土壤环境的适应性，决定了不同地理分布具有自己的优势种群。根据近年的调查发现，黄淮海地区蛴螬对花生等农作物危害严重，其中暗黑鳃金龟幼虫是花生主产区的优势种群（数据另文发表）。本研究在河北沧州本地土壤中分离得到一种异小杆线虫，并鉴定该线虫为嗜菌异小杆线虫沧州品系。利用该线虫对蛴螬进行室内侵染试验，结果证明该线虫对当地不同金龟子幼虫有不同程度的致病力，而且对低龄幼虫的致死率较高，同时与其他种昆虫病原线虫相比有较高的致病力。因此，综合考虑田间蛴螬的优势种类（暗黑鳃金龟）以及蛴螬的发育阶段采取合适的防治措施，为田间使用该线虫防治蛴螬提供重要依据。

致谢　河北省农林科学院植物保护研究所陈书龙老师为本实验提供线虫，并帮助完成昆虫病原线虫形态学鉴定；中国农业科学院植物保护研究所彭德良老师在昆虫病原线虫鉴定方面提供指导；甘肃农业大学张军鸽硕士研究生、中国农业科学院彭焕硕士研究生在分子生物学鉴定过程中给予帮助。在此一并致谢！

参 考 文 献（References）

Adams BJ，Burnell AM，Powers TO，1998. A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis*（Nemata：Rhabditidae）based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology*，30（1）：22 - 39.

Ansari MA，Tirry L，Moens M，2003. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthus*（Coleoptera：Scarabaeidae）. *Biological Control*，28（1）：111 - 117.

Chen SL，Li XH，Lin YJ，2004. Effect of pre infection behaviour on infectivity of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis*. *Journal*

of Hebei Agricultural Sciences, 8(4): 9 - 14. [陈书龙, 李秀花, 林英杰, 2004. *Steinernema feltiae* 和 *Heterorhabditis megidis* 侵染前行为对其侵染力的影响. 河北农业科学, 8(4): 9 - 14]

Cong B, Liu WZ, Yang HW, 1999. Advances on the research and application of entomopathogenic nematode. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 30(3): 343 - 353. [丛斌, 刘维志, 杨怀文, 1999. 昆虫病原线虫研究和利用的历史、现状与展望. 沈阳农业大学学报, 30(3): 343 - 353]

Dunphy GB, Thurston GS, 1990. Insect immunity. In: Gaugler R, Kaya HK eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL. 301 - 323.

Ehlers RU, 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects with regards to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 303 - 316.

Georgis R, Gaugler R, 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol*, 84: 713 - 720.

Grewal PS, Lewis EE, Gaugler R, Campbell JF, 1994. Host finding behaviour as a predicator of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108: 207 - 215.

Grewal PS, Power KT, Grewal SK, Suggars A, Haupricht S, 2004. Enhanced consistency in biological control of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) with new strains of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 30: 73 - 82.

Hashmi G, Glazer I, Gaugler R, 1996. Molecular comparisons of entomopathogenic nematodes using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Fundam. Appl. Nematol.*, 19(4): 399 - 406.

Joyce SA, Burnell AM, Powers TO, 1994. Characterization of *Heterorhabditis* isolates by PCR amplification of segment of mtDNA and rDNA genes. *Journal of Nematology*, 26(3): 260 - 270.

Koppenhöfer AM, Fuzy EM, 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biological Control*, 28(1): 47 - 59.

Li XF, Wang GH, 1990. A preliminary study on the application of entomopathogenic nematodes against striped flea beetle. *Acta Phytophylacica Sinica*, 17(3): 229 - 231. [李小峰, 王国汉, 1990. 昆虫病原线虫对黄曲条跳甲幼虫防治的初步研究. 植物保护学报, 17(3): 229 - 231]

Liu J, Berry RE, 1995. Differentiation of isolates in the genus *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) by random amplified polymorphic DNA fragments and morphological characters. *Parasitology*, 111(1): 119 - 125.

Luo C, Guo XJ, Zhang ZL, 2008. Species identification of white grubs in lawns around Beijing and their damage characteristics. *Acta Entomologica Sinica*, 51(1): 108 - 112. [罗晨, 郭晓军, 张芝利, 2008. 京郊草坪蛴螬的种类和为害特点. 昆虫学报, 51(1): 108 - 112]

Nguyen KB, Maruniak J, Adams BJ, 2001. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology*, 33(2-3): 73 - 82.

Nguyen KB, Smart GC Jr, 1995. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 27(2): 206 - 212.

Phan LK, Subbotin SA, Waeyenberge L, Moens M, 2005. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema robustispiculum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from Chumomray National Park in Vietnam. *Systematic Parasitology*, 60: 23 - 32.

Reid AP, Hominick WM, 1992. Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Parasitology*, 105: 317 - 323.

Samish M, Glazer I, 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends Parasitol.*, 17(8): 368 - 372.

Seinhorst JW, 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67 - 69.

Stack CM, Easwaramoorthy SG, Metha UK, Downes MJ, Griffin CT, Burnell AM, 2000. Molecular characterisation of *Heterorhabditis indica* isolates from India, Kenya, Indonesia and Cuba. *Nematology*, 2(5): 477 - 487.

Wang LX, Yang XF, Jian H, Yang HW, Huang DF, 2001. Metabolites produced by bacteria of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 41(6): 753 - 756. [王立霞, 杨秀芬, 简恒, 杨怀文, 黄大昉, 2001. 昆虫病原线虫共生细菌的代谢产物. 微生物学报, 41 (6): 753 - 756]

White GF, 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66: 302 - 303.

Zhang ZR, Cao L, Liu XL, Wang GH, Xu ZF, Han RC, 2006. Screening of insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes *Steinernema longicaudum* X-7. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(1): 68 - 73. [张中润, 曹莉, 刘秀玲, 王果红, 许再福, 韩日畴, 2001. 昆虫病原线虫 *Steinernema Longicaudum* X-7 增效剂的筛选. 昆虫知识, 43(1): 68 - 73]

(责任编辑: 赵利辉)